Aus der IV. Medizinischen Universitätsklinik Berlin
Leiter Professor Dr. H. Dennig.

Über das Vorkommen gerinnungshemmender Stoffe in Rotalgen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin.

Eingereicht
von
Wilhelm Broser
aus
Neutitschein.

21. August 1939.

Druck: L. V. Enders'sche Kunstanstalt, Neutitschein. 1939.

M 139

Aus der IV. Medizinischen Universitätsklinik Berlin
Leiter Professor Dr. H. Dennig.

Über das Vorkommen gerinnungshemmender Stoffe in Rotalgen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin.

Eingereicht
von
Wilhelm Broser
aus
Neutitschein.

21. August 1939.

Druck: L. V. Enders'sche Kunstanstalt, Neutitschein. 1939.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Berlin.

Dekan: Prof. Kreuz
Referent: Prof. Dennig
Korreferent: Prof. v. Bergmann.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhalt.

1. Theoretische Einleitung.
2. Ein neues Meßverfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit gerinnungshemmender Stoffe.
3. Zahlenmäßiger Vergleich einiger Heparin-Handelspräparate.
4. Feststellung eines gerinnungshemmenden Bestandteiles in Agar-Agar.
5. Gerinnungshemmende Auszüge aus der Droge Carrageen, D. A. B. 6.
6. Zusammenfassung der Ergebnisse.
7. Literaturhinweise.
8. Lebenslauf.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543927_0039

Theoretische Einleitung.

Das von Howell entdeckte Heparin, welches außer in der Leber neuerdings auch in der Lunge und Milz gefunden wurde (4*]), stellt bis heute das wirksamste Präparat zur Hemmung der Blutgerinnung dar. Auf Grund der Arbeiten von A. F. Charles, D. A. Scott (5), E. Jorpes (8) und anderer muß man im Heparinmolekül ein stickstoffhaltiges Polysaccharid annehmen, das mit Schwefelsäure verestert ist. Wahrscheinlich kommt ganz allgemein hochmolekularen Schwefelestern eine gerinnungshemmende Wirkung zu. Nachgewiesen wurde diese Eigenschaft z. B. beim polyanetholsulfosaurem Natrium, das als Liquoid Roche im Handel ist (6), und bei Schwefelsäureestern von Stärke, Cellulose, Chitin, Glykogen und ähnlichen Verbindungen, die S. Bergström (1) dargestellt hat.

Es lag nahe, nun auch natürlich vorkommende Polysacharyd-Schwefelsäureester auf ihre gerinnungshemmende Wirkung zu untersuchen. Solche Ester kommen besonders reichlich in Meeresalgen vor. — Einen Anreiz für die Untersuchung bot der Umstand, daß heparinähnliche Substanzen für medizinische und technische Zwecke eine gewisse Bedeutung erlangen können.

Nach Entwicklung eines Verfahrens, welches eine schnelle und zahlenmäßige Bestimmung der gerinnungshemmenden Wirkung gestattet (vergl. Dissertation Bürgel, Berlin 1937) wurden von mir zwei Drogen — Agar-Agar und Carrageen — auf diese Eigenschaft untersucht. Agar-Agar ist der durch mehrstündiges Auskochen gewisser Rotalgen — vor allem Gracilaria-, Eucheuma-, Gelidium- und Gloiopeltis-Arten — dargestellte gallertbildende Bestandteil und enthält alle löslichen Kohlenhydrate dieser Meeresalgen (12). C. Neuberg und H. Ohle (10) haben im Kohlenhydrat aus Agar-Agar organisch-gebundene Schwefelsäure nachgewiesen; M. Lüdtke (9) bestimmte den Gehalt an Schwefel zu

*] siehe Literaturangaben.

1—1,2%. Die andere von mir untersuchte Droge — Carrageen — besteht vornehmlich aus zwei im nordatlantischen Ozean vorkommenden Rotalgenarten und zwar zur Hauptsache aus dem Knorpeltang (Chondrus crispus [L.] Stackh.) und zum geringeren Teil aus Kerntang (Gigartina mammilosa [Good. et Woodw.] J. Ag.). Der Knorpeltang enthält nach den Arbeiten von P. Haas (7), B. Russel-Wells (11) und M. R. Butler (3) einen stickstoffhaltigen und mit Schwefelsäure veresterten Polysaccharidkomplex. Auch im Kerntang ist, wie wohl in allen Rotalgen, ein Polysaccharidschwefelsäureester anzunehmen.

Tatsächlich konnten in beiden Drogen hochwirksame, die Blutgerinnung hemmende Stoffe nachgewiesen werden.

Ein neues Meßverfahren zur Bestimmung der Wirksamkeit gerinnungshemmender Stoffe.

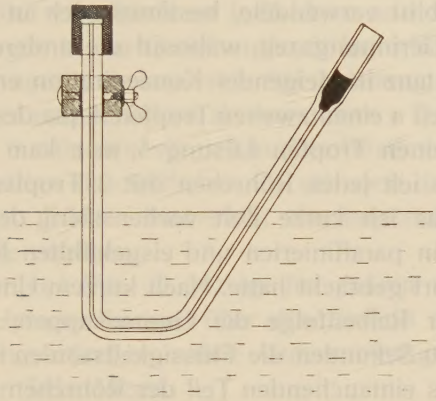
In der Literatur findet man eine große Anzahl von Methoden, mit denen man Messungen der Gerinnungszeit verschiedener Stoffe durchführen kann (eine kurze Übersicht siehe in der Dissertation von E. Bürgel). In der Mehrzahl handelt es sich um solche, die Verzögerungszeiten von über 5 Minuten bei Zugabe von gerinnungshemmenden Mitteln vergleichen. Zu diesen Bestimmungen wird standardisiertes Tierblut verwendet. Diese Methoden haben den Nachteil, komplizierte Vorbereitungen zu benötigen, ferner viel Zeit zu beanspruchen und beachtliche Fehlerquellen zu enthalten.

Bisher war es auch nicht möglich, absolute Zahlen für die Wirkung einer gerinnungshemmenden Substanz auf die Blutgerinnung anzugeben.

Durch Bestimmung der Grenzwirksamkeit habe ich die Möglichkeit, absolute Werte anzugeben, wie auch die Mängel der anderen Methoden auf ein Minimum zu reduzieren.

Unter Grenzwirksamkeit verstehe ich die Verdünnung eines gelösten Stoffes, die eine eben noch meßbare Verzögerung (10 bis 15 Sekunden) der Gerinnungszeit bewirkt. Zu diesem Zwecke bediente ich mich einer Apparatur, die im Wesentlichen aus einer Anzahl U-förmig gebogener Kapillaren besteht.

Nachstehend eine dieser Kapillaren im Querschnitt. Die Basis betrug 4 cm, die Höhe 12 cm und die Lichtung 1,6 mm.



Sechs dieser Kapillaren wurden in einen schwenkbaren Rahmen so eingespannt, daß sie zwangsläufig gleiche Bewegungen ausführen mußten. Zur Hälfte tauchten sie in ein Wasserbad von 40° ein.

Zur Durchführung einer Bestimmung versah ich zunächst den eingespannten Schenkel jedes Röhrchens mit einer Gummikappe, wie oben gezeichnet. In den Trichter brachte ich sodann mit einem Glasstäbchen einen Tropfen Aqua dest.*), der durch die oben erwähnte, luftdicht abschließende Gummikappe am Einlaufen in die Kapillare gehindert wurde. Dadurch war es mir möglich, die weiteren Flüssigkeiten in den Trichter zu bringen, sie zu mischen und sie zur selben Zeit hinablaufen zu lassen.

Wenn ich nun z. B. Heparin B untersuchen wollte, versetzte ich zunächst 1 mg Heparin mit 10 ccm Aqua dest. Diese Lösung bezeichnete ich als Ausgangskonzentration 0. Durch Verdünnen dieser Lösung 0 auf das Doppelte mit Aqua dest. erhielt ich die

*) Bei späteren Versuchen wurde gekochtes Aqua dest. (CO_2 frei) verwendet. Es zeigte sich aber, daß der CO_2-Gehalt des Wassers keine erheblichen Fehler verursachte.

Verdünnung 1, die also nur die halbe Konzentration enthielt. Durch gleiches Weiterverdünnen erhielt ich die Lösung 2, 3, 4 usw.

Die sechs Röhrchen will ich fortlaufend von links nach rechts mit a, b, c—f bezeichnen. Da ich in seiner Gerinnungszeit wechselndes Frischblut verwendete, bestimmte ich in Röhrchen a die unbeeinflußte Gerinnungszeit, während die anderen die zu untersuchende Substanz in steigender Konzentration enthielten. Ich gab also in Röhrchen a einen zweiten Tropfen Aqua dest., in Röhrchen b zum Beispiel einen Tropfen Lösung 5, in c kam Lösung 4 usw. Dann versetzte ich jedes Röhrchen mit 3 Tropfen frischen Menschenblutes, das ich kurze Zeit vorher steril der Armvene entnommen und in paraffinierten und eisgekühlten Reagenzröhrchen zum Versuchsort gebracht hatte. Nach kurzem Umrühren entfernte ich in schneller Reihenfolge die Gummikappen, sodaß ungefähr innerhalb 8—10 Sekunden die Flüssigkeitssäulen in den in Wasser von 40° Celsius eintauchenden Teil der Röhrchen einfließen konnten. Alle 5 Sekunden stellte ich durch Hin- und Herbewegen des Rahmens samt Kapillaren den Gerinnungszeitpunkt jedes Röhrchens fest. Als Zeitpunkt der Gerinnung sah ich das sehr gut erkennbare Stocken der Blutsäule an. Auf einer bei Blutentnahme in Bewegung gesetzten Stoppuhr las ich die Zeit für jedes einzelne Röhrchen ab.

Die Grenzwirksamkeit eines Stoffes war sofort aus der Konzentration desjenigen Röhrchens, das eine deutliche Verzögerung (10—15 Sekunden) gegenüber Röhrchen a besaß, abzulesen. Als Beispiel führe ich Versuch I mit Heparin A an.

Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzögerung der Gerinnung in Sekunden bei Verdünnung					
	1:128 $\times 10^5$	1:64 $\times 10^5$	1:32 $\times 10^5$	1:16 $\times 10^5$	1:8 $\times 10^5$	1:4 $\times 10^5$
280	0	0	10	30	40	
315				30	50	85

Zur Vereinfachung gebe ich nicht Verdünnung 8, 7, 6 usw. an, sondern die tatsächliche Konzentration. Die Ergebnisse sind natürlich nur größenordnungsmäßige Werte. Der Leerversuch entspricht

dem Röhrchen a. In diesen Werten ist bereits berücksichtigt, daß die Lösung der wirksamen Substanz (ein Tropfen) in der Kapillare noch auf das Fünffache (+ 1 Verschlußtropfen, + 3 Tropfen Blut = 5 Tropfen) verdünnt wurde.

Die durch Blut verschiedener Individuen und die durch natürliche Schwankungen in der Gerinnungszeit beim Einzelindividuum bedingten Streuungen scheinen sich bei Messung der Grenzkonzentration weniger auszudrücken, als wenn man z. B. Verzögerungszeiten von über 5 Minuten vergleicht. Die Bestimmungen sind in ungefähr 10 Minuten durchführbar. Es sei noch darauf hingewiesen, daß nur bei größter Sauberkeit die angestellten Versuche brauchbare Werte ergeben.

Wie E. Bürgel (Nr. 2) gezeigt hat, lassen sich mit dieser Methode auch Untersuchungen über den Einfluß der Temperatur auf die Gerinnung anstellen, sowie Untersuchungen gerinnungsbeschleunigender Substanzen.

Im Folgenden bringe ich Untersuchungen verschiedener Heparin-Handelspräparate, um die Brauchbarkeit der Methode zu zeigen.

Zahlenmäßiger Vergleich einiger Heparin-Handelspräparate.

Es standen mir vier Heparine deutscher Firmen zur Verfügung, die ich im Folgenden mit A, B, C und D bezeichnen werde*). Sie unterschieden sich schon makroskopisch von einander, da sie in Lösung bei gleicher Konzentration deutliche Farbunterschiede aufwiesen. Das später als am wirksamsten festgestellte Präparat A ist in einer Lösung von 7 mg in 10 ccm Aqua dest. klar und durchsichtig, während 4 mg Heparin C in 10 ccm Aqua dest. eine kräftig braungelbe Färbung aufwies. Diese Erscheinung läßt darauf schließen, daß in den verschiedenen Präparaten Gemische einer hochwirksamen Substanz mit mehr oder weniger Fremdstoffen vorhanden sind.

*) Den Firmen Schering-Kahlbaum A. G., Berlin, Dr. Theodor Schuchardt GmbH, Görlitz, Dr. G. Grübler & Co., Leipzig, bin ich für die Überlassung der notwendigen Substanzen zu Dank verpflichtet. — Außerdem wurde Heparin-Promonta (Hamburg) untersucht.

Als erstes Präparat untersuchte ich Heparin A, indem ich 7 mg in 10 ccm Aqua dest. löste und fortlaufende Verdünnungen untersuchte. Im Folgenden bringe ich diese Versuchsergebnisse.

Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzögerung der Gerinnung in Sek. bei Verdünnung									
	1:16×10^6	1:8×10^6	1:4×10^6	1:2×10^6	1:10^6	1:5×10^5	1:25×10^4	1:128.000	1:56.000	1:28.000
405						30	60	105	495	3795
300					20	40	50	170	480	
330		0	10	20	50	60				
300		10	20	50	85	120				
280	0	0	10	30	40					

Zur Kontrolle untersuchte ich eine zweite Einwage desselben Präparates von 10 mg auf 10 ccm Aqua dest.

Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzögerung der Gerinnung in Sek. bei Verdünnung				
	1:128 10^5	1:64 10^5	1:32 10^5	1:16 10^5	1:8 10^5
300	0	0	15	25	35
355	0	5	20	50	125

Somit ergibt sich als Grenzwirksamkeit bei der ersten Einwage 1:4,000.000, bei der zweiten 1:3,200.000. Wenn in Betracht gezogen wird, daß ich bei diesen Versuchen nur größenordnungsmäßige Werte erhalte, muß das Ergebnis als vollauf zufriedenstellend bezeichnet werden.

Im Folgenden bringe ich die Versuchsergebnisse von Heparin B, C und D.

Heparin B:

Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzögerung der Gerinnung in Sek. bei Verdünnung				
	1:16 $\times 10^5$	1:8 $\times 10^5$	1:4 $\times 10^5$	1:2 $\times 10^5$	1 $\times 10^5$
235	0	5	35	45	95
320	0	15	40	50	60

Heparin C:

	1:4 $\times 10^5$	1:2 $\times 10^5$	1 $\times 10^5$	1:5 $\times 10^5$	1:25 $\times 10^3$	1: 12.500
300	0	0	5	125	295	
300		10	20	95		
330		0	25	65	90	135

Heparin D:

	1:16$\times 10^5$	1:8$\times 10^5$	1:4$\times 10^5$	1:2$\times 10^5$	1:10^5	1:5$\times 10^4$	1:25$\times 10^3$	1:12.500
415	0	0	0	0	20			
395		0	0	0	125	265		
265				0	30	65	130	195

Somit ergaben sich also folgende Grenzwirksamkeiten:

Heparin A: 1:3,000.000
Heparin B: 1:800.000
Heparin C: 1:100.000
Heparin D: 1:100.000.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, daß das Ansteigen der Verzögerungszeit nicht bei allen Präparaten gleichmäßig ist, sondern daß Heparin A als das wirksamste von der Grenzkonzentration

$1:32\times10^5$ bis $1:4\times10^5$ nur eine geringe Verzögerungssteigerung bewirkte, die erst ab $1:2\times10^5$ ein starkes Anwachsen zeigte.

Bei den Heparinpräparaten C und D stieg dagegen die Verzögerungszeit sofort nach Überschreiten des Schwellenwertes stark an. Dies ließe vielleicht darauf schließen, daß in den unreinen Präparaten eine Gegenkomponente vorhanden ist, die, einmal ausgeschaltet, keinen Einfluß auf die Gerinnungshemmung ausübt. Trotzdem bleiben auch bei höheren Konzentrationen (größere Gerinnungszeiträume) die Unterschiede der Heparinpräparate A, B, C und D bestehen. Die Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Konzentration des hemmenden Stoffes ist von E. Bürgel (2) untersucht worden.

Feststellung eines gerinnungshemmenden Bestandteiles in Agar-Agar.

Ich stellte Auszüge von dem im Handel befindlichen Agar-Agar her und zwar sowohl aus der pulverisierten wie auch aus der faserigen Droge. Beide zeigten ihrer Wirkung nach keine Differenz. Ich versetzte jeweils 10 g der Droge mit 200 ccm Aqua dest. und mit einem Konservierungsmittel, da ohne dieses sich sehr rasch Mikroorganismen entwickeln, die eine durch Schwefelwasserstoff gekennzeichnete Zersetzung bewirken. Unter gelegentlichem Umschütteln ließ ich die Aufschwemmung 3—4 Tage bei Zimmertemperatur (etwa 20°) stehen. Die nach dieser Zeit etwas zähflüssige Lösung zentrifugierte oder filtrierte ich, um die Flüssigkeit von den ungelösten Bestandteilen zu trennen.

Auch bei Zusatz von Konservierungsmitteln findet, wenn auch wesentlich später, ein mit Schwefelwasserstoffentwicklung einhergehendes Nachlassen der Wirkung statt. Deshalb dampfte ich die Lösung nach 3—4 Tagen im Vakuum bei 40° Celsius ein. Die zur Trockne eingestampfte Substanz ist nach meinen bisherigen Erfahrungen haltbar. Als Konservierungsmittel benützte ich Toluol, Nipasol, Nipagin oder Trikesol. Es zeigte sich, daß die Wirksamkeit der Auszüge nach 5 Tagen abnimmt. Ich stellte mit einem Ansatz aus 10 g Agar-Agar + 200 ccm Wasser + 2 Tropfen Toluol fortlaufend alle 24 Stunden einen Versuch an, wobei ich jedesmal

den Gehalt der Auszüge an Trockensubstanz ermittelte. Das Ergebnis zeigt folgende Tabelle:

Tage nach Ansatz	Konzentration	Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzög. d. Gerinn. in Sek. bei Verdünnung						
			1:120.000	1:32.000	1:8.000	1:4.000	1:2.000	1:1.000	1:500
1. Tag	c = 0,7 3	280			35	50	60	80	110
2. Tag	c = 1,1	340	5	15	25		65		200
3. Tag	c = 1,1	300	0	15	40		60		225
4. Tag	c = 1,1	320	0	40	60		100		235
5. Tag	c = 0,992	355	10	15	50		75		175
6. Tag	c = 1,0	180	0	10	25		50		150
7. Tag	c = 1,006	310	0	0	10		35		60

10 g Agar-Agar + 200 ccm Aqua dest. + 6 Tropfen Toluol.

Es ergibt sich also eine Grenzwirksamkeit von 1:32.000. Da die Konzentrationsschwankungen im Verhältnis zu den Verdünnungsdifferenzen nur unwesentlich sind, habe ich sie in der Aufstellung unberücksichtigt gelassen.

Ich versuchte durch Zugabe von 3% Ammoniak die Extraktion der wirksamen Substanz zu verbessern. Ich ging dabei von der Annahme aus, daß in der ammoniakalischen Lösung die Loslösung der Polysaccharidschwefelsäureester leichter vonstatten geht. Dies zeitigte jedoch nicht nur keinen Erfolg, sondern bewirkte sogar eine weitere Schwächung der gerinnungshemmenden Wirkung.

Tage nach Ansatz	Konzentration	Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzög. d. Gerinn. in Sek. bei Verdünnung				
			1:8000	1:4000	1:2000	1:1000	1:500
1. Tag	c = 1,0	290	0	0	0	15	40
3. Tag	c = 1,0	250	0	0	10	15	35

10 g Agar-Agar + 200 ccm Aqua dest. (mit 3% Ammoniak) + 6 Tropfen Toluol.

In einem weiteren Versuch stellte ich fest, ob Erhitzen auf höhere Temperaturen die gerinnungshemmende Wirkung beeinträchtigt.

Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzögerung der Gerinnung bei Verdünnung 1:500 bei 20 Minuten Erhitzen auf:			
	100°	70°	50°	unerhizt
420	0	35	55	55

5 g Agar-Agar + 100 ccm Aqua dest. + 0,2 g Nipasol.

Es hatte also ein Erhitzen auf 50° Celsius keinen Einfluß auf die gerinnungshemmende Wirkung, ein Erhitzen auf 70° hatte bereits eine deutliche Abschwächung zur Folge und Kochen hob sie ganz auf. Auf diese Erscheinung dürfte auch die niedrige Grenzwirksamkeit von Agar-Agar gegenüber Carrageen zurückzuführen sein. Die Droge Agar-Agar wird nämlich aus Rotalgen durch mehrfaches Kochen gewonnen.

Gerinnungshemmende Auszüge aus der Droge Carrageen D.A.B. 6.

Carrageen besteht zum größten Teil aus den beiden Rotalgen Chondrus crispus (L.) Stackh. und Gigartina mammilosa (Good et Woodw.) J. Ag. Carrageen ist als offizinelle Droge im Handel. Bei der Herstellung werden die Algen nur getrocknet und nicht wie Agar-Agar gekocht. Ich untersuchte wäßrige Auszüge nach der gleichen Methode wie Agar-Agar, nur versetzte ich jeweils 5 g der Droge mit 200 ccm Aqua dest. und mit Toluol oder Nipasol als Konservierungsmittel. Es zeigte sich, daß bei höherer Konzentration die Lösung zu zähflüssig wurde. Um einheitliche Ergebnisse zu erhalten, machte ich diese Versuche nicht mit der durch Zentrifugierung gewonnenen Lösung, sondern mit Einwaagen von Trockensubstanz, die ich in Aqua dest. löste. Dadurch wurde es mir möglich, die Versuche nach beliebiger Zeit zu wiederholen.

Im Folgenden bringe ich eine Auswahl von Versuchen mit verschiedenen Ansätzen und Konservierungsmitteln (s. Tabelle).

	Tage nach Ansatz	Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzögerung der Gerinnung in Sekunden bei Verdünnung													
			$1:32\times10^5$	$1:16\times10^5$	$1:8\times10^5$	$1:4\times10^5$	$1:2\times10^5$	$1:10^5$	$1:5\times10^4$	$1:25\times10^3$	1:15'000	1:8.000	1:4.000	1:2.000	1:1.000	1:500
I.	3 Tag	300			10	20	40	75	135							
	4. Tag	355		0	10	15	20	35								
II.	2. Tag	310	0	0	0	20	35									
	3. Tag	325		0	10	30	35	45								
III.	3. Tag	240			0	15	30	50	60							
	4. Tag										130	250	1010	1730	≦	
IV.	4. Tag	320										270	415	960	≦	≦
	6. Tag	365									170		330		975	≦

I.: 25 g Carrageen + 1000 ccm Aqua dest. + 2 ccm Toluol.
II.: 50 g Carrageen + 2000 ccm Aqua dest. + 4 ccm Toluol.
III.: 25 g Carrageen + 1000 ccm Aqua dest. + 1 g Nipasol
(Das Nipasol löste sich beim Kochen teilweise).
IV.: 5 g Carrageen + 200 ccm Aqua dest. + 0,5 ccm Toluol.

Es ergibt sich also bei vorsichtiger Auswertung der Versuche eine Grenzwirksamkeit von 1:400.000.

Die Ansätze von Carrageen waren ebenso wie die aus Agar-Agar nur beschränkte Zeit voll wirksam. Bei älteren Lösungen läßt sich die Zersetzung durch einen unangenehmen, fauligen Geruch erkennen. Um dauerhafte Substanzen zu erhalten, dampfte ich die drei Tage alten Lösungen im Vakuum bei 40° ein. Die erhaltene Trockensubstanz ist nach meinen bisherigen Erfahrungen unbegrenzt haltbar. Zum Beispiel stellte ich mit der Trockensubstanz von Ansatz II 35 Tage nach Ansatz folgenden Versuch an:

Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzögerung der Gerinnung bei Verdünnung in Sek.				
	1:8 $\times 10^5$	1:4 $\times 10^5$	1:2 $\times 10^5$	1: 10^5	1:8 $\times 10^4$
300	10	15	25	35	80

Auch eine durch einen Seitzfilter geschickte und dadurch entkeimte Lösung behält, steril aufbewahrt, ihre Wirkung. Der entsprechende Versuch wurde ebenfalls mit einer sterilen Lösung von Ansatz II 31 Tage nach Ansatz durchgeführt und zeigte ähnliche Werte.

Nachdem ich mit meinen Untersuchungen so weit war, versuchte ich das Produkt der wäßrigen Lösung zu reinigen, um dadurch seine Wirksamkeit zu erhöhen. Zuerst machte ich Untersuchungen an Produkten einer Elektrodialyse. Ich benützte dazu Ansatz IV, von dem ich zunächst vor der Elektrodialyse einer Grenzwirksamkeitsbestimmung machte, sowie nachher. Es zeigte sich, daß die Lösung von der Grenzwirksamkeit 1:400.000 nachher keine nachweisbare gerinnungsverzögernde Wirkung hatte. Ich untersuchte die zur Trocknung eingedampfte feste Substanz.

Eine Dialyse dauerte 3 Stunden 20 Minuten und wurde mit 500 ccm einer 1%igen Lösung durchgeführt. 90 Minuten nach Beginn saugte ich 100 ccm ab, welche ich ebenfalls eindampfte und untersuchte. Auch hier konnte ich keine gerinnungshemmende Wirkung nachweisen. Die Menge der Trockensubstanz hatte sich in beiden Dialysaten stark verringert.

In der ursprünglich trüben Lösung bildeten sich zahlreiche weiße Flocken. Da der Flüssigkeitsspiegel im Innern stark stieg, mußte ich von Zeit zu Zeit eine größere Menge absaugen.

Eine Erklärung für die Wirksamkeitseinbuße wäre vielleicht darin zu suchen, daß man annimmt, daß die wirksame Substanz ein Elektrolyt ist, der durch den Strom aufgespalten wurde.

Nun versuchte ich durch Fällungen eine Reinigung zu erzielen. Zuerst mit Fällen durch absoluten Alkohol. Ich versetzte einen Teil der Carrageenlösung mit 2 Teilen 96%igem Alkohol. Es fiel ein weißer Niederschlag auf, der sich im Wasser gut löste. Ich untersuchte sowohl das Fällungsprodukt als auch das eingedampfte Filtrat.

Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzögerung der Gerinnung in Sek. bei Verdünnung					
	1:16 $\times 10^5$	1:8 $\times 10^5$	1:4 $\times 10^5$	1:2 $\times 10^5$	1: 10^5	1:5 $\times 10^4$
I.						
320 390	0	20 25	25 40	35 55	45 65	70
II.						
190	0	0	5	5	5	

I. Alkoholfällung (Grenzwirksamkeit 1:800.000).
II. Alkoholfiltrat (unwirksam).

Die unter II angegebenen Verzögerungszeiten von 5 Sekunden sind durch die Zeitspanne von der Entfernung der ersten bis zur letzten Gummikappe zu erklären. Wie auch weitere Versuche zeigten, kam dem Alkoholfiltrat keine meßbare gerinnungshemmende Wirkung zu.

Einen zweiten Fällungsversuch stellte ich mit Aceton an. Hierbei versetzte ich zwei Teile Lösung mit drei Teilen Aceton.

Gerinnungszeit für Leerversuch in Sekunden	Verzögerung der Gerinnung in Sek. bei Verdünnung					
	1:32 $\times 10^5$	1:16 $\times 10^5$	1:8 $\times 10^5$	1:4 $\times 10^5$	1:2 $\times 10^5$	1: 10^5
I.						
300		10	15	35	45	70
II.						
290	0	0	0	0	0	

I.: Acetonfällung. II.: Acetonfiltrat.

Wenn ich die immer erreichbare Grenzkonzentration von 1:400.000 als Maßstab annehme, gelang es mir also mit Hilfe der Fällung durch Alkohol oder Aceton sie auf 1:800.000 zu erhöhen.

Da ich die Fällungsversuche mit Ansätzen durchführte, deren Grenzwirksamkeit 1:400.000 ich vorher feststellte, ist die Möglichkeit der Wirksamkeitserhöhung durch Fällung als sicher anzunehmen.

Ich erhielt auch Rohauszüge aus Carrageen, die eine erheblich größere Grenzwirksamkeit hatten. Diese Versuche waren jedoch nicht jederzeit reproduzierbar, weshalb ich sie in meiner Darstellung unberücksichtigt gelassen habe.

Es ist jedenfalls bemerkenswert, daß die offizinelle Droge Carrageen beinahe zur Hälfte aus einer Substanz besteht, die mindestens die Wirksamkeit des Heparin B, also des zweitbesten der von mir untersuchten Heparinpräparate, besitzt. 25 g Carrageen ergeben etwa 1000 ccm einer 1—1,1%igen Lösung, also insgesamt 10—11 g wirksame Substanz, d. i. eine theoretische Ausbeute von 40—44% bezogen auf das Rohmaterial. Praktisch läßt sich diese Ausbeute jedoch nicht ganz erreichen, da eine vollständige Abtrennung der Flüssigkeit von den gequollenen — jedoch ungelösten — Algenteilen durch Abpressen oder Zentrifugieren nicht gelingt. Ich bin überzeugt, daß die Wirksamkeit des Rohpräparates aus Carrageen noch erheblich durch weitere Reinigung gesteigert werden kann.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Als Maßstab für die Wirksamkeit aktiver Stoffe, welche die Blutgerinnung hemmen, wird die Grenzwirksamkeit vorgeschlagen. Hierunter wird diejenige Verdünnung verstanden, bei der die Gerinnung menschlichen Gesamtblutes gerade noch deutlich meßbar (10—15 Sekunden) verzögert wird. Eine für die Bestimmung der Grenzwirksamkeit geeignete Apparatur wird beschrieben.

2. Die neu ausgearbeitete Methode wurde zum Vergleich einiger Heparin-Handelspräparate benützt. Diese ergaben folgende Werte für die Grenzwirksamkeit:

Präparat:	*Grenzwirksamkeit:*
Heparin A	1:3,000.000
Heparin B	1:800.000
Heparin C	1:100.000
Heparin D	1:100.000.

3. Auf Grund theoretischer Überlegungen wurden einige aus Meeresalgen bestehende Drogen auf ihren Gehalt an gerinnungshemmenden Stoffen untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß den Rohauszügen aus Agar-Agar eine gerinnungshemmende Wirkung von der Grenzwirksamkeit 1:30.000 (bezogen auf Trockensubstanz) zukommt.

4. Auszüge aus der Droge Carrageen (D.A.B.6) zeigten eine Grenzwirksamkeit von 1:400.000 (bezogen auf Trockensubstanz). Diese Zahl ist als Mindestwert zu betrachten, der immer erreicht werden kann. Es ergab sich eine Ausbeute an wirksamer Substanz von 40—44% (bezogen auf das Rohmaterial). Während die Auszüge vom 5. Tag an an Wirksamkeit verlieren, sind sie als Trockensubstanz oder als sterile Lösung haltbar. Durch Fällen der Lösungen mit Alkohol oder Aceton läßt sich eine Steigerung der Grenzwirksamkeit auf 1:800.000 erzielen.

Für die Stellung des Themas und Unterstützung bei den Versuchen danke ich Herrn Dr. Elsner, ebenso Herrn Dr. Groscurth für wertvolle Anregungen.

Literaturangaben.

1. S. Bergström: Naturwiss. *23* (1935), 706.
   „ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. *238*, 163 (1936).
2. E. Bürgel, Dissertation 1937, Berlin
3. R. M. Butler, Biochemic. J. *28*, 759 (1934).
   „ „ *29*, 1925 (1935).
4. A. F. Charles u. D. A. Scott: Trans. Roy. Soc. Canada Sect. V. (3) *28*, 55, 1934.
5. A. F. Charles u. D. A. Scott: Biochemical J *30*, 1927 (1936).
6. V. Demole, M. Reinert: Arch. f. exp. Path. *158*, 211 (1930).
7. P. Haas, Biochemic. J *15*, 469 (1921).
8. E. Jorpes, Naturwiss. *23*, 196 (1935).
   „ Biochemic. J *29*, 1817 (1935).
   „ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. *244*, 253 (1936).
9. M. Lüdtke, Biochem. Z. *212*, 419 (1929).
10. C. Neuberg u. H. Ohle: Biochem. Z. *125*, 311 (1921).
11. B. Russel-Wells: Biochemic. J. *16*, 578 (1922).
12. J. v. Wiesner, Die Rohstoffe des Pflanzenreiches, 4. Aufl., (Leipzig 1928), Seite 1849.

Lebenslauf.

Am 1. Oktober 1913 wurde ich, Wilhelm Karl Gustav Martin Walter Broser, in Neutitschein i. Mähren als Sohn des Lic. Arpad Broser geboren. Nach dem Besuch der fünfklassigen Volksschule in Neutitschein ging ich 1924 auf das deutsche Staats-Reform-Realgymnasium. Dortselbst bestand ich meine Reifeprüfung im Jahre 1932 und begann mein medizinisches Studium an der deutschen Universität in Prag, wo ich 1934 mein Vorphysikum ablegte. Im Herbst 1934 übersiedelte ich mit meinen Eltern nach Berlin, wo ich mein Studium an der Friedrich-Wilhelms-Universität fortsetzte. 1935 bestand ich hier das Physikum und am 8. Juli 1938 das medizinische Staatsexamen. Im April 1935 erhielt ich die deutsche Reichsangehörigkeit. Das praktische Jahr absolvierte ich an der IV. med. Universitätsklinik, Berlin.